

University of Groningen

## Regulation of carbon dioxide fixation in the chemoautotroph *Xanthobacter flavus*

Keulen, Geertje van

**IMPORTANT NOTE:** You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

*Document Version*

Publisher's PDF, also known as Version of record

*Publication date:*

2000

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

*Citation for published version (APA):*

Keulen, G. V. (2000). *Regulation of carbon dioxide fixation in the chemoautotroph Xanthobacter flavus*. s.n.

### Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

### Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

## **CHAPTER 7**

### **SUMMARY AND CONCLUDING REMARKS**

### **NEDERLANDSE SAMENVATTING**

## SUMMARY AND CONCLUDING REMARKS

Autotrophic bacteria and plants are able to convert the greenhouse gas carbon dioxide, CO<sub>2</sub>, into cell material. Although there are a number of metabolic pathways supporting autotrophic growth, the Calvin cycle is the most widely distributed of these. CO<sub>2</sub> fixation requires a large amount of energy which originates from light or chemical oxidation, supporting respectively photoautotrophic or chemoautotrophic growth. Only three enzymes are specific for the Calvin cycle: ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO), phosphoribulokinase (PRK), and sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase). The other Calvin cycle (iso)enzymes are also employed in glycolysis and the pentose phosphate pathway. The ecology, biochemistry, and physiology of bacteria employing the Calvin cycle is described in the review in Chapter 1. Carboxysomes are also described in this chapter which are specialized organelles containing RuBisCO encountered in a number of chemoautotrophic bacteria.

*Xanthobacter flavus* grows chemoautotrophically using energy derived from oxidation of methanol, formate, thiosulfate, or hydrogen. In addition, a wide variety of organic substrates (e.g. gluconate or succinate) support heterotrophic growth (13).

Most of the genes encoding Calvin cycle enzymes have been identified in *X. flavus* and they are organized into two transcriptional units: the *cbb* and *gap-pgk* operons (11;12;15;25). The *cbbLSXFPTAE* operon encodes the unique Calvin cycle enzymes RuBisCO (*cbbLS*) and PRK (*cbbP*) plus a number of isozymes. The *cbbF* and *cbbA* genes, encode respectively fructosebisphosphatase (FBPase) and FBP aldolase. These enzymes have different characteristics than their heterotrophic counterparts, which makes them especially suited for a role in the Calvin cycle (25;27). For example, CbbF displays a high SBPase activity which is unique to the Calvin cycle. The *cbb* operon is only expressed when CO<sub>2</sub> fixation is required; maximum induction occurs during growth in the absence of multicarbon compounds and in the presence of substrates supporting autotrophic growth (1;13).

The constitutively expressed *gap-pgk* operon encodes two glycolytic enzymes, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoglyceratekinase (PGK); the activity of these enzymes is increased sixfold when the Calvin cycle is induced (15). The expression of non-unique Calvin cycle enzymes encoded within the *cbb* operon, and the superinduction of the *gap-pgk* operon, strongly suggest that a simple induction of the unique Calvin cycle enzymes is not sufficient to support autotrophic growth. Instead, extensive rearrangements in central carbon metabolism are required to sustain the high flux of carbon through the pool of triosephosphates and phosphorylated pentoses to regenerate the CO<sub>2</sub>-accepting molecule, ribulose-5-phosphate.

The Calvin cycle needs to be carefully regulated because it consumes large amounts of energy which could be used for other purposes if CO<sub>2</sub> fixation were not absolutely required. The LysR-type transcriptional regulator CbbR, common to most autotrophic bacteria employing the Calvin cycle studied to date, regulates the expression of Calvin cycle genes (2;9;12;16;17;20;31). CbbR is encoded directly upstream of, and is transcribed divergently from the *cbb* operon in *X. flavus* (26). It is required for expression of the *cbb* operon and for the superinduction of the *gap-pgk* operon (15). The interaction of CbbR with the *cbb* promoter and its ligand is described in a later section as well as the physiological significance of its ligand.

In order to identify transcriptional regulators in addition to CbbR, an *X. flavus* mutant was isolated with a reduced expression of a *cbb::lacZ* fusion when grown on succinate (Chapter 2). This mutant could not grow autotrophically; the growth rate on succinate or gluconate was reduced. Complementation of the mutant showed that the mutation was not located in a regulatory gene but in *tpi*, encoding the glycolytic enzyme triosephosphate isomerase. This gene represents the third transcriptional unit required for autotrophic growth in addition to the *cbb* and *gap-pgk* operons. Since the mutation in *tpi* affected both heterotrophic and

autotrophic growth, it is likely that *X. flavus* has only one *tpi* gene. Interestingly, a *tpi* gene is not present in any of the *cbb* operons studied to date.

There are a number of similarities between TPI, GapDH and PGK. The three enzymes form the glycolytic branch of the Calvin cycle. Like the *tpi* gene, the *gap-pgk* operon is also present in single copy and is used for both hetero- and autotrophic metabolism. However, the regulation of expression of *tpi* is different from *gap-pgk* expression. In contrast to the CbbR-controlled superinduction of the *gap-pgk* operon, expression of *tpi* is constitutive as indicated by TPI enzyme activities and expression of *tpi::lacZ* (Chapter 3). Apparently, the activity of TPI is high enough to sustain the large carbon flux through the pool of triosephosphates in the Calvin cycle required for CO<sub>2</sub> fixation. The *tpi* gene is the only example of a gene which is absolutely essential for autotrophic growth that is not under control of CbbR.

Chapter 3 also characterizes the full-length sequence of the *tkt* gene, encoding a second transketolase of *X. flavus*, which was previously identified upstream of *gap-pgk* (15). Transketolase is an enzyme that functions in both the Calvin cycle and the pentose phosphate pathway. Low levels of transketolase activity were present during heterotrophic growth. The activity rapidly increased following a transition to autotrophic growth, similar to the superinduction of the *gap-pgk* operon (Chapter 3). The increase in transketolase activity following induction of the Calvin cycle is likely due to induction of the *cbb* operon (with *cbbT*) because this did not occur in a *cbbR* mutant. Furthermore, expression of a *tkt::lacZ* fusion was constitutive. It is not clear whether the transketolase isoenzymes have similar characteristics or that CbbT is tailored to function in the Calvin cycle.

The constitutive expression of Tkt is mirrored by another pentose phosphate pathway enzyme, transaldolase. Its reversible activity is replaced by the combined activities of aldolase (CbbA) and the irreversible and ATP-stimulated activity of SBPase (CbbF) in the Calvin cycle. The presence of both transaldolase and aldolase/SBPase during autotrophic growth is surprising, since transaldolase activity may create a futile cycle. The constitutive expression of transaldolase and Tkt during autotrophic growth could indicate that *X. flavus* only recently acquired the *cbb* operon and that mechanisms to repress *tkt* and the transaldolase-encoding gene have not yet evolved. Alternatively, substrate channeling could be enabled by formation of specific complexes of Calvin cycle and/or pentosephosphate cycle enzymes which would allow both pathways to function simultaneously and independently. These complexes have been observed for both Calvin cycle and pentosephosphate cycle enzymes in plants and in certain bacteria (3;7;21;32) and may require specific chaperones to form productive protein-protein interactions.

One objective of this research was to understand the molecular mechanisms by which CbbR governs the expression of the *cbb* and *gap-pgk* operons (Chapters 4, 5 and 6). For this purpose, CbbR was overexpressed in large quantities in *Escherichia coli* and purified to homogeneity. CbbR of *X. flavus* is a dimer of 36-kDa subunits. Previous work showed that CbbR forms two complexes with the *cbb* promoter (26). Two CbbR binding sites were identified following analysis of the interaction of CbbR with the *cbb* promoter using DnaS1 footprinting (Chapter 4). CbbR has a high affinity for the *cbb* promoter distal binding site and low affinity for the promoter proximal binding site confirming the previously observed cooperative binding of CbbR to the *cbb* promoter (26).

Comparison of the protected nucleotides in the *cbb* promoter of *X. flavus* with those of *Thiobacillus ferrooxidans* and *Ralstonia eutropha*, allowed the identification of a consensus CbbR binding site: TnA-n<sub>7/8</sub>-TnA (Chapters 1 and 6). Although only two CbbR dimers bind to the *cbb* promoter in *X. flavus*, three CbbR consensus binding sites were identified, two of which partially overlap. The presence of consensus CbbR binding sites in the *cbb* operon promoters and a high degree of sequence similarity in the DNA binding domains of CbbR of chemoautotrophic bacteria indicates that the mechanism of transcription activation by CbbR in these bacteria may be similar. In addition, it was shown that CbbR introduces a bend in the DNA as implied by a hypersensitive site in the DnaS1 footprinting studies. Studies using circular permuted DNA fragments showed that the bending angle is 64°.

The Calvin cycle is induced when *X. flavus* is confronted with the absence of suitable carbon sources, while autotrophic substrates such as  $H_2$  are available. It is therefore likely that signal metabolites emanating from carbon and/or energy metabolism control expression of the Calvin cycle in concert with CbbR. The intracellular concentration of a glycolytic intermediate (e.g. phosphoenolpyruvate (PEP), or acetyl coenzyme A) may signal sufficient availability of carbon sources as was suggested by studies with mutants of *X. flavus* (11), *R. eutropha* (6;18), and *Pseudomonas oxalaticus* (14). An increased energy status and/or redox balance of the cell may transduce the signal of sufficient redox power as could be represented by intracellular concentrations of compounds such as NAD[P](H), ATP, ADP, AMP and GTP. Previous work suggested a correlation between the generation of reducing power and the induction of the Calvin cycle in autotrophic bacteria (4;10;19;29). Interestingly, the activity of PRK is stimulated by NADH and inhibited by PEP (22); the activity of SBPase is activated by ATP (27).

It is likely that CbbR interacts with at least one of these metabolites. In Chapter 4 it is shown that of the metabolites tested, only NADPH has a significant effect on the DNA binding characteristics of CbbR. Addition of NADPH at saturating concentrations (200  $\mu$ M) increased the binding affinity of CbbR for the *cbb* promoter threefold and caused a 9° relaxation of the bending angle in the DNA introduced by CbbR upon binding. The apparent  $K_{dNADPH}$  of CbbR was determined to be 75  $\mu$ M.

It would be interesting to elucidate the molecular basis of the interaction between NADPH and CbbR. NADPH has an allosteric regulatory effect on CbbR which is likely to cause a conformational change. It is therefore not surprising that the amino acids that form the classical NAD(P)[H] binding fold involved in enzyme catalysis (30), are not present in the CbbR primary structure. The recently elucidated crystal structure of bacterial PRK provided new insights into the allosteric binding pocket of NADH and AMP, which respectively activate and inhibit this enzyme (5;8). It was suggested that a number of positively charged arginine residues have direct interactions with the phosphate moieties of NADH and AMP which leads to a change in the conformation of PRK resulting in a change in PRK activity. More hints as to which amino acid residues form the NADPH binding domain of CbbR can be obtained from the structure of the ligand binding domain of CysB (24). This LysR-type protein is a close relative of CbbR, that has four regions important for binding of its ligand, sulfate. These four amino acid stretches are conserved in all CbbR proteins and contain a number of invariable arginine residues (figure 5 Chapter 1) which may line the NADPH binding pocket of CbbR. The other conserved residues of CbbR inside or outside the four amino acid stretches may also be important for interactions with NADPH (e.g. Thr104 and Pro167) or may transduce the conformational change. Interestingly, NADPH can be modeled in the ligand binding cavity of a CbbR-superimposed structure of CysB (K. Verschueren, personal communication). Crystallization experiments with wild type CbbR are promising because small crystals of CbbR have already been obtained (K. Verschueren, personal communication). When large crystals are obtained and the crystal structure is solved, more information may come available about the NADPH binding cavity of CbbR. It is also interesting to see whether, in analogy to PRK, AMP(-analogs) are NADPH-antagonists in CbbR activation which would possibly repress transcription of the *cbb* operon.

Whether the NADPH concentrations mentioned in the above are significant *in vivo* is described in Chapter 5. It was shown that the redox balances and NAD(P)H concentrations increased rapidly immediately following induction of autotrophic metabolism by the addition of formate to gluconate-grown *X. flavus*. The formation of NADH is coupled to the immediate appearance of NAD-dependent formate dehydrogenase whereas transhydrogenase may be a link to the generation of NADPH. The maximum redox balance was reached two hours after induction of autotrophic metabolism induction and subsequently decreased rapidly. The sharp decrease in redox balance coincided with the appearance of an operational Calvin cycle as indicated by RuBisCO activity and the superinduction of PGK. It is likely that the high demand of autotrophic  $CO_2$  fixation for NADH accounts for the observed decrease in

redox balance. The Calvin cycle was induced as the concentration of NADPH approached its maximum, which corresponds to an intracellular NADPH concentration of 189 to 216  $\mu\text{M}$ . This is actually the saturating concentration of CbbR determined in the *in vitro* experiments described above. While the redox balances returned to levels prior to autotrophic growth induction, the NADPH concentration remained two-fold higher at a corresponding intracellular concentration of 81-93  $\mu\text{M}$ . This concentration is slightly above the previously reported  $K_{\text{dNADPH}}$  of 75  $\mu\text{M}$  for CbbR *in vitro*. The expression levels of the *cbb* operon correspond well to the degree of NADPH-saturation of CbbR.

The combined *in vitro* and *in vivo* results strongly support the hypothesis that the CbbR-NADPH complex induces transcription of the *cbb* and *gap-pgk* operons which allow the cell to maintain a favourable redox balance and to assimilate biomass. Consequently, the Calvin cycle will be expressed whenever an increased redox balance and NADPH concentration is encountered. The Calvin cycle therefore functions as an electron sink for excess reducing power during mixotrophic growth when the heterotrophic substrate is used for anabolic reactions. During autotrophic growth, the Calvin cycle allows buildup of biomass via the fixation of  $\text{CO}_2$  and dissipates excess reducing power (figure 6 in Chapter 1).

The data presented in Chapter 5 show that even during heterotrophic growth of *X. flavus* sufficient NADPH is available to activate part of the CbbR population. In theory this should lead to a low level expression of Calvin cycle enzymes during heterotrophic growth, which is however not observed. It is therefore likely that an additional regulator of the *cbb* operon is present which represses expression during heterotrophic growth, and may respond to the intracellular concentration of an glycolytic intermediary metabolite such as PEP. Two observations support this hypothesis. Normally, the *cbb* operon is not expressed during heterotrophic growth of *X. flavus* on succinate. However, when *X. flavus* harbours multiple copies of the *cbb* promoter, a low level of *cbb* expression is observed during growth on succinate. This was shown by the appearance of RuBisCO enzyme activities and by the appearance of  $\beta$ -galactosidase when the *cbb* promoter was fused to *lacZ*. A likely explanation for this observation is that a repressor protein is titrated away when multiple copies of the *cbb* promoter are present. This results in a low level of *cbb* expression due to the presence of CbbR dimers with bound NADPH.

Additional indications that regulatory proteins other than CbbR control expression of the *cbb* operon come from the characterization of three *X. flavus* mutants with opposite effects on *cbb* expression derived from a *cbbL::lacZ* fusion present in multiple copies during heterotrophic growth on succinate. In addition, the three mutants display two different phenotypes. Strains B1 and B7, showing an enhanced *cbb* expression of the *cbb::lacZ* fusion, could grow on  $\text{H}_2/\text{CO}_2$  and could not grow on methanol whereas strain G4, showing a lowered *cbb* expression of the *cbb::lacZ* fusion, could not grow on both substrates. Interestingly, these mutants could be complemented with the same large *HindIII*-fragment (>50kb) of an *X. flavus* genomic library which may encode a repressor protein or another regulatory protein. In analogy to *Rhodobacter* spp. and *Rhodospirillum rubrum*, the presence of a regulatory system which links  $\text{CO}_2$  fixation in *X. flavus* to other redox power-consuming pathways is not unlikely.

Chapter 6 describes the analysis of the interaction between CbbR and the three consensus CbbR binding sites described in the above. Studies were performed with a set of mutated *cbb* promoters with altered consensus CbbR-binding site nucleotides and with altered spacing between CbbR binding sites. Our results support a dimer repositioning (sliding dimer) model of transcription activation by CbbR which was previously proposed for the LysR-type transcriptional regulators OxyR and OccR (23;28). In this model, the first CbbR dimer binds to the high affinity *cbb* promoter distal binding site ( $\text{IR}_1$ ). A second CbbR dimer is subsequently recruited to the low affinity *cbb* promoter proximal site, which is composed of two partially overlapping binding sites ( $\text{IR}_2$  and  $\text{IR}_3$ ) of which only one can be occupied at the same time. The second CbbR dimer positions itself at either the middle binding site ( $\text{IR}_2$ ) or the *cbb* promoter proximal binding site ( $\text{IR}_3$ ). It is probably sliding between sites  $\text{IR}_2$  and  $\text{IR}_3$  in response to the presence or absence of CbbR-saturating NADPH concentrations

which causes different bending angles of respectively 55° or 64° in the *cbb* promoter. Without the high affinity binding site IR<sub>1</sub>, CbbR binding and *cbb* expression is abolished. Binding site IR<sub>3</sub> also overlaps the -35 sequence of the core promoter indicating that binding to IR<sub>3</sub> may interfere with binding of RNA polymerase to the *cbb* promoter. Mutations in IR<sub>3</sub> lead to constitutive promoters which are still autotrophically inducible, albeit to a lesser extent than the wild-type *cbb* promoter. IR<sub>3</sub> may therefore be a repressor site. CbbR binding to the middle binding site IR<sub>2</sub> may recruit RNA polymerase to the core promoter and allows the formation of a productive transcription initiation complex to start transcribing the *cbb* operon.

Spacing mutations of the *cbb* promoter reveal that binding of CbbR dimers occurs at the same side of the DNA helix. Insertion of one helical turn of DNA between IR<sub>1</sub> and IR<sub>2/3</sub> resulted in a constitutive promoter indicating CbbR dimers bound at positions IR<sub>1</sub> and IR<sub>2</sub>. With one helical turn inserted, binding of the second CbbR to site IR<sub>3</sub> is probably not feasible because the extra turn cannot be accommodated. Consequently, binding of the second dimer to IR<sub>2</sub> is forced and allows transcription activation under non-inducing conditions. *cbb* promoters with insertions of less or more than one helical turn could not bind a second CbbR dimer and as a result these *cbb* promoters were silent.

#### Reference List

1. **Croes, L. M., W. G. Meijer, and L. Dijkhuizen.** 1991. Regulation of methanol oxidation and carbon dioxide fixation in *Xanthobacter* strain 25a grown in continuous culture. *Arch.Microbiol.* **155**:159-163.
2. **Gibson, J. L. and F. R. Tabita.** 1993. Nucleotide sequence and functional analysis of CbbR, a positive regulator of the Calvin cycle operons of *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **175**:5778-5784.
3. **Gontero, B., J. Ricard, and J. Ricard.** 1988. A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. *Eur.J.Biochem.* **173**:437-443.
4. **Hallenbeck, P. L., R. Lerchen, P. Hessler, and S. Kaplan.** 1990. Roles of CfxA, CfxB, and external electron acceptors in regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase expression in *Rhodobacter sphaeroides*. *J.Bacteriol.* **172**:1736-1748.
5. **Harrison, D. H. T., J. A. Runquist, A. Holub, and H. M. Miziorko.** 1998. The crystal structure of phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* reveals a fold similar to that of adenylate kinase. *Biochemistry* **37**:5074-5085.
6. **Im, D. and C. G. Friedrich.** 1983. Fluoride, hydrogen and formate activate ribulosebisphosphate carboxylase formation in *Alcaligenes eutrophus*. *J.Bacteriol.* **154**:803-808.
7. **Joint, I. R., I. Morris, and R. C. Fuller.** 1972. Purification of a complex of alkaline fructose 1,6-bisphosphatase and phosphoribulokinase from *Rhodospirillum rubrum*. *J.Biol.Chem.* **247**:4833-4838.
8. **Kung, G., J. A. Runquist, H. M. Miziorko, and D. H. T. Harrison.** 1999. Identification of the allosteric regulatory site in bacterial phosphoribulokinase. *Biochemistry* **38**:15157-15165.
9. **Kusano, T. and K. Sugawara.** 1993. Specific binding of *Thiobacillus ferrooxidans* RbcR to the intergenic sequence between the *rbc* operon and the *rbcR* gene. *J.Bacteriol.* **175**:1019-1025.
10. **Lascelles, J.** 1960. The formation of ribulose 1:5-diphosphate carboxylase by growing cultures of *Athiorhodaceae*. *J.Gen.Microbiol.* **23**:499-510.
11. **Meijer, W. G.** 1994. The Calvin cycle enzyme phosphoglycerate kinase of *Xanthobacter flavus* required for autotrophic CO<sub>2</sub> fixation is not encoded by the *cbb* operon. *J.Bacteriol.* **176**:6120-6126.
12. **Meijer, W. G., A. C. Arnberg, H. G. Enequist, P. Terpstra, M. E. Lidstrom, and L. Dijkhuizen.** 1991. Identification and organization of carbon dioxide fixation genes in *Xanthobacter flavus* H4-14. *Mol.Gen.Genet.* **225**:320-330.
13. **Meijer, W. G., L. M. Croes, B. Jenni, L. G. Lehmicke, M. E. Lidstrom, and L. Dijkhuizen.** 1990. Characterization of *Xanthobacter* strains H4-14 and 25a and enzyme profiles after growth under autotrophic and heterotrophic growth conditions. *Arch.Microbiol.* **153**:360-367.
14. **Meijer, W. G. and L. Dijkhuizen.** 1988. Regulation of autotrophic metabolism in *Pseudomonas oxalaticus* OX1 wild-type and an isocitrate-lyase-deficient mutant. *J.Gen.Microbiol.* **134**:3231-3237.
15. **Meijer, W. G., E. R. E. van den Bergh, and L. M. Smith.** 1996. Induction of the *gap-pgk* operon encoding glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and 3-phosphoglycerate kinase of *Xanthobacter flavus* requires the LysR-type transcriptional activator CbbR. *J.Bacteriol.* **178**:881-887.

16. **Paoli, G. C., P. Vichivanives, and F. R. Tabita.** 1998. Physiological control and regulation of the *Rhodobacter capsulatus* *cbb* operons. *J.Bacteriol.* **180**:4258-4269.
17. **Paoli, G. C., F. Soyer, J. M. Shively, and F. R. Tabita.** 1998. *Rhodobacter capsulatus* genes encoding form I ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (*cbbLS*) and neighbouring genes were acquired by a horizontal gene transfer. *Microbiology* **144**:219-227.
18. **Reutz, I., P. Schobert, and B. Bowien.** 1982. Effect of phosphoglycerate mutase deficiency on heterotrophic and autotrophic carbon metabolism of *Alcaligenes eutrophus*. *J.Bacteriol.* **151**:8-15.
19. **Richardson, D. J., G. F. King, D. J. Kelly, A. G. McEwan, S. J. Ferguson, and J. B. Jackson.** 1988. The role of auxiliary oxidants in maintaining the redox balance during phototrophic growth of *Rhodobacter capsulatus* on propionate or butyrate. *Arch.Microbiol.* **150**:131-137.
20. **Strecker, M., E. Sickinger, R. S. English, J. M. Shively, and E. Bock.** 1994. Calvin cycle genes in *Nitrobacter vulgaris* T3. *FEMS Microbiol.Lett.* **120**:45-50.
21. **Suss, K. H., C. Arkona, R. Manteuffel, and K. Adler.** 1993. Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* **90**:5514-5518.
22. **Tabita, F. R.** 1988. Molecular and cellular regulation of autotrophic carbon dioxide fixation in microorganisms. *Microbiol.Rev.* **52**:155-189.
23. **Toledano, M. B., I. Kullik, F. Trinh, P. T. Baird, T. D. Schneider, and G. Storz.** 1994. Redox-dependent shift of OxyR-DNA contacts along an extended DNA-binding site: a mechanism for differential promoter selection. *Cell* **78**:897-909.
24. **Tyrrell, R., K. H. Verschueren, E. J. Dodson, G. N. Murshudov, C. Addy, and A. J. Wilkinson.** 1997. The structure of the cofactor-binding fragment of the LysR family member, CysB: a familiar fold with a surprising subunit arrangement. *Structure.* **5**:1017-1032.
25. **van den Bergh, E. R. E., S. C. Baker, R. J. Raggers, P. Terpstra, E. C. Woudstra, L. Dijkhuizen, and W. G. Meijer.** 1996. Primary structure and phylogeny of the Calvin cycle enzymes transketolase and fructosebisphosphate aldolase of *Xanthobacter flavus*. *J.Bacteriol.* **178**:888-893.
26. **van den Bergh, E. R. E., L. Dijkhuizen, and W. G. Meijer.** 1993. CbbR, a LysR-type transcriptional activator, is required for expression of the autotrophic CO<sub>2</sub> fixation enzymes of *Xanthobacter flavus*. *J.Bacteriol.* **175**:6097-6104.
27. **van den Bergh, E. R. E., T. A. W. van der Kooij, L. Dijkhuizen, and W. G. Meijer.** 1995. Fructosebisphosphatase isoenzymes of the chemoautotroph *Xanthobacter flavus*. *J.Bacteriol.* **177**:5860-5864.
28. **Wang, L. and S. C. Winans.** 1995. The sixty nucleotide OccR operator contains a subsite essential and sufficient for OccR binding and a second subsite required for ligand-responsive DNA bending. *J.Mol.Biol.* **253**:691-702.
29. **Wang, X., D. L. Falcone, and F. R. Tabita.** 1993. Reductive pentose phosphate-independent CO<sub>2</sub> fixation in *Rhodobacter sphaeroides* and evidence that ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase activity serves to maintain the redox balance of the cell. *J.Bacteriol.* **175**:3372-3379.
30. **Wierenga, R. K., P. Terpstra, and W. G. J. Hol.** 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding  $\beta\alpha\beta$ -fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J.Mol.Biol.* **187**:101-107.
31. **Windhövel, U. and B. Bowien.** 1991. Identification of *cfxR*, an activator gene of autotrophic CO<sub>2</sub> fixation in *Alcaligenes eutrophus*. *Mol.Microbiol.* **5**:2695-2705.
32. **Wood, T., C. C. Muzariri, and L. Malaba.** 1985. Complex formation between transketolase, transaldolase, and glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *Int.J.Biochem.* **17**:1109-1115.



## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Van

### **“Regulatie van de fixatie van koolstofdioxide in the chemoautotrofe bacterie *Xanthobacter flavus*”**

Doorgaans zijn de pagina's voorafgaand aan de Nederlandse samenvatting in een proefschrift onleesbaar voor niet-ingewijden. Daarom is gepoogd een samenvatting te schrijven die toegankelijk is voor meer mensen dan de direct-ingewijden.

#### *Koolstofdioxide*

De chemische verbinding koolstofdioxide (chemische formule: CO<sub>2</sub>) staat langzamerhand bij het grote publiek bekend als een gevaarlijk broeikasgas. Al decennialang wordt door milieuvactivisten naar een lagere uitstoot van CO<sub>2</sub> gestreefd vanwege het gevaar voor een opwarmende aarde. Daarom zie je dat bedrijven die zich verantwoordelijk voelen in de aanplant van bomen in bv. het regenwoud investeren. Planten staan bekend om hun CO<sub>2</sub>-opnamecapaciteiten; ze leven er van. Ze worden als de belangrijkste producenten van organisch materiaal beschouwd waar mens en dier weer op kunnen gedijen. Er zijn echter micro-organismen die ook CO<sub>2</sub> vast kunnen leggen in biomassa en die zo een bijdrage aan het begin van de voedselketen leveren.

#### *Micro-organismen*

Micro-organismen zijn heel kleine levende wezens die meestal niet met het blote oog te zien zijn. Ze zijn in de meest uiteenlopende omgevingen te vinden: op en in andere levende wezens, in de bodem, en in allerlei vormen van water inclusief hete bronnen en poolijs. Hoewel micro-organismen ziekteverwekkers kunnen zijn, hebben de meeste een nuttige functie. Om te kunnen groeien, moeten voedingsstoffen opgenomen worden en in nieuw celmateriaal omgezet worden. De groeisnelheid is afhankelijk van meerdere parameters zoals bijvoorbeeld de temperatuur en de soort voedingsstof. Wie kent niet de verhalen over voedselvergiftiging door urenleng bewaarde lauwe sateetjes waarin ziekteverwekkende bacteriën zich kunnen uitleven tijdens Koninginnedag! De meeste micro-organismen prefereren voedingsstoffen die snelle groei bevorderen boven voedingsstoffen waar ze langzamer door groeien.

#### *Autotrofe groei*

Als een organisme in staat is om CO<sub>2</sub> tot celmateriaal te assimileren wordt gezegd dat het “autotroof” kan groeien. Deze specifieke stofwisseling vraagt veel energie. Wordt deze energie verkregen uit licht (bv. bij planten), dan heet het proces van CO<sub>2</sub>-fixatie “fotoautotrofie”. Sommige bacteriën zijn in staat “chemoautotroof” te groeien wanneer de benodigde energie geleverd wordt door chemische oxidatie van stoffen als H<sub>2</sub> (waterstof) of methanol (resp. ook brandstof voor raketten en Indycars). Omdat deze verbindingen als energiebron voor koolstofdioxidefixatie dienen, worden ze ook wel autotrofe voedingsstoffen genoemd.

De bodem- en zoetwaterbacterie *Xanthobacter flavus* kan chemoautotroof groeien. Het groeit echter sneller op organische voedingsstoffen waarbij de assimilatie tot celmateriaal minder energie kost. Waarom moeilijk doen als het makkelijk kan.

Maar als het snelle groeien niet meer kan doordat er onvoldoende “snelle” voedingsstoffen beschikbaar zijn, dan moet de bacterie zich dat zo snel mogelijk realiseren om tegenmaatregelen te kunnen nemen. *X. flavus* kan naar autotrofe groei omschakelen als er geen of onvoldoende voedingsstoffen zijn terwijl er wel bepaalde, autotrofe, energiebronnen aanwezig zijn. Hoe *X. flavus* beide omstandigheden waarneemt en CO<sub>2</sub>-fixatie reguleert, is onderwerp van deze studie.

### *Eiwitten, enzymen en genexpressie*

Een stofwisselingsroute, zoals die voor glucoseafbraak of CO<sub>2</sub>-fixatie, bestaat normaliter uit enkele opeenvolgende chemische reacties die echter zelden spontaan in de cel plaatsvinden. De reacties worden versneld door de katalyserende werking van specifieke eiwitten: enzymen. De term enzym is ook bekend van wasmiddelen waaraan enzymen worden toegevoegd om vet en vuil bij een lagere wastemperatuur te helpen afbreken.

In de cel zijn enzymen en andere eiwitten in groten getale aanwezig om de cellulaire processen een handje te helpen. De cel verzorgt zelf de aanmaak van eiwitten door bepaalde genen tot expressie te brengen. Om de resultaten in dit proefschrift te begrijpen, is het noodzakelijk te weten wat “genexpressie” is. Allereerst de begrippen:

Een gen is een specifiek, afgebakend deel van het erfelijk materiaal (DNA) van een cel dat het bouwplan vormt voor één bepaald eiwit. DNA is voor te stellen als een lineaire keten van twee ineengewikkelde strengen.

Transcriptie is het maken van meerdere, tijdelijke kopieën (mRNA) van één of meerdere genen.

Een operon bestaat uit twee of meer genen die tezamen naar mRNA worden gekopieerd.

Het promotor-DNA is het DNA vóór een gen of operon dat tekens bevat die voor initiatie van transcriptie zorgen. Het bestaat vaak uit een algemeen deel (kempromotor) en een specifiek deel (voor regulatorbinding), die belangrijk zijn voor correcte transcriptie-initiatie.

Bij translatie wordt, volgens het bouwplan van het mRNA, het eiwit uit aminozuren opgebouwd die via peptidenbindingen gekoppeld worden. Ten slotte wordt door vouwing van de eiwitketen een functioneel eiwit verkregen.

Genexpressie is de vorming van een eiwit met een specifieke functie voor de cel voortvloeiend uit transcriptie, translatie en eiwitvouwing. Genexpressie kan op alle niveaus gereguleerd worden. Dit proefschrift beschrijft o.a. de regulatie van de expressie op transcriptieniveau van een operon dat nodig is voor autotrofe groei.

### *Calvin-cyclus*

Misschien klinken stofwisselingsroutes zoals de “glycolyse” of de “citroenzuurcyclus” nog enigszins bekend in de oren door bestudering van het glucosemetabolisme in de biologieles. De CO<sub>2</sub>-fixatiestofwisselingsroute die door de meeste organismen gehanteerd wordt, heeft de naam van zijn onderdekkers gekregen: de Calvin-Benson-Bassham-cyclus of kortweg de Calvin-cyclus (ook wel CBB-cyclus). Een volledig overzicht van de veertien reacties in de Calvin cyclus is in Hoofdstuk 1 (figuur 1) gegeven. Drie enzymen die alléén in de Calvin-cyclus voorkomen (RuBisCO, PRK en SBPase), zorgen voor drie unieke Calvin-cyclusreacties. Er is veel over de unieke enzymen bekend, bv. welke metabolieten (bepaalde tussenproducten van stofwisselingsroutes) effect hebben op de activiteit van de unieke enzymen. De andere elf reacties verlopen via enzymen die gelijk zijn aan enzymen van andere stofwisselingsroutes zoals de glycolyse, of via enzymen die dezelfde reactie kunnen uitvoeren, maar niet gelijk zijn aan enzymen van andere stofwisselingsroutes zoals de pentosefosfaatroute (iso-enzymen, collega-enzymen). Over deze enzymen is minder bekend dan over de unieke Calvin-cyclus enzymen.

### *Expressie van Calvin-cyclusgenen in Xanthobacter flavus*

Voorgaande onderzoekers hebben de meeste genen van Calvin-cyclus enzymen van *X. flavus* opgespoord. De autotrofe genen blijken zich in twee operonen te bevinden: het *cbb*-operon en het *gap-pgk*-operon. Het *cbb*-operon codeert o.a. voor de unieke Calvin-cyclusenzymen en voor een aantal collega-enzymen. Het wordt alleen tot expressie gebracht als CO<sub>2</sub>-fixatie vereist is. Het *gap-pgk*-operon codeert voor twee enzymen uit de glycolyse, GAPDH en PGK, die tijdens heterotrofe groei altijd tot expressie gebracht worden. De expressie van het *gap-pgk*-operon neemt tijdens autotrofe groei sterk toe. De hogere activiteiten van de enzymen GAPDH en PGK zijn namelijk hard nodig om de Calvin-cyclus operationeel te maken. Even herhalen, autotrofe groei van *X. flavus* heeft tot gevolg dat het *cbb*-operon nieuw tot expressie komt en de expressie van het *gap-pgk*-operon neemt sterk toe. Het is verder duidelijk dat expressie van alleen de unieke Calvin-

cyclusenzymen onvoldoende is om CO<sub>2</sub> te kunnen fixeren. Een uitgebreide reorganisatie van de bestaande koolstof-stofwisselingsroutes is voor autotrofe groei een vereiste.

Al zoekende naar onbekende genen die betrokken zijn bij de regulatie van autotrofe groei, werd het gen voor het enzym TPI gevonden (Hoofdstuk 2). TPI is net als GAPDH en PGK een enzym dat behalve in de glycolyse ook in de Calvin-cyclus actief is. *X. flavus* blijkt maar één *tpi*-gen te hebben, dat altijd op hetzelfde niveau tot expressie komt of het nu autotroof (langzaam) of heterotroof (snel) groeit (Hoofdstuk 3). Het *tpi*-gen is het enige voorbeeld van een gen dat absoluut voor autotrofe groei vereist is maar dat tijdens autotrofe groei niet hoger tot expressie komt!

Er is ook een studie uitgevoerd naar de regulatie van expressie van het collega-enzym (TKT) van het Calvin-cyclusenzym CbbT. Een deel van het collega-gen (*tkt*) was al eerder gevonden en is in dit onderzoek verder gekarakteriseerd (Hoofdstuk 3). Hieruit blijkt dat de CbbT- en TKT-collega-enzymen geen directe duplicaties van elkaar zijn. TKT komt tijdens autotrofe en heterotrofe groei op hetzelfde niveau tot expressie, in tegenstelling tot CbbT dat alleen tijdens autotrofe groei tot expressie komt.

De reacties die TKT en CbbT katalyseren, komen voor in de Calvin-cyclus en ook in de pentosefosfaatstofwisselingsroute. Een ander enzym uit de laatste route blijkt ook constant aanwezig te zijn en katalyseert een omkeerbare reactie die volgt op de TKT-reactie. Deze reactie is in de Calvin-cyclus door een tweestapsreactie vervangen. Eén van de twee enzymen die deze reactie katalyseren is het gereguleerde, unieke Calvin-cyclusenzym SBPase is. Door SBPase wordt de reactie onomkeerbaar. Het is onduidelijk waarom beide systemen tijdens autotrofe groei naast elkaar opereren en elkaar mogelijk zelfs tegenwerken. Twee verklaringen zijn mogelijk. 1: De regulatie van expressie is nog niet ver genoeg ontwikkeld. Het zou kunnen dat de fijnafstemming van de regulatie nog niet afgerond is en verder evolueert. 2: De enzymen van de twee stofwisselingsroutes geven de reactieproducten alléén door aan enzymen van de eigen stofwisselingsroute doordat ze enigszins aan elkaar geklit zijn. Dit is een beetje te vergelijken met twee verschillende fabrieksassemblagelijnen waarbij twee (vrijwel gelijke) producten worden gemaakt en waarvan de gereedschappen langs de assemblagelijnen gelijk zijn of veel op elkaar lijken.

#### *Het regulatoreiwit CbbR*

Uit vorig onderzoek is gebleken dat het transcriptieregulatie-eiwit CbbR de (extra) expressie van de *cbb*- en *gap-pgk*-operonen reguleert. Zonder CbbR is autotrofe groei door *X. flavus* niet mogelijk. *X. flavus* merkt dat het moet overschakelen naar autotrofe groei als er een tekort aan voedingsstoffen dreigt en er tegelijkertijd geschikte autotrofe energiebronnen aanwezig zijn. CbbR doet tenminste één van deze waarnemingen en zorgt vervolgens voor transcriptieactivatie van de autotrofe genen. Hoe dit proces in zijn werk gaat, is onderzocht in dit promotieonderzoek.

Eerst is CbbR zelf onderzocht. Het *cbbR*-gen bevindt zich direct naast het eerste gen (*cbbL*) van het *cbb*-operon en wordt altijd tot expressie gebracht (Hoofdstuk 6). Na translatie wordt het functionele CbbR gevormd door twee monomere CbbR eiwitketens samen te vouwen tot één geheel, een dimeer (Hoofdstuk 4). De promotor van het *cbb*-operon, van belang voor transcriptie-initiatie, bevindt zich in het stukje DNA tussen het *cbbR*-gen en het *cbb*-operon.

#### *CbbR en DNA binding*

De interactie tussen CbbR en de *cbb*-promotor is ook bepaald. Bekend is dat CbbR twee eiwit-DNA-complexen vormt met de *cbb*-promoter. Via een ingewikkelde techniek (footprinting) zijn twee bindingsplaatsen met hoge en lage affiniteit voor CbbR op de *cbb*-promotor afgebakend (Hoofdstuk 4). Dit is enigszins voor te stellen als het bepalen van de omtrek van het gebied waar CbbR de promotor bedekt. Als je vervolgens CbbR weghaalt, wordt dat gebiedje blootgelegd en kan je bepaalde kenmerken op gaan stellen. Door deze gebiedjes te vergelijken met de door CbbR afgebakende delen van *cbb*-promotors van twee andere chemoautotrofe bacteriën, is bepaald welke delen van de *cbb*-promoter door het CbbR-eiwit worden herkend en algemeen geldend zijn. Verder is vastgesteld dat de binding

van twee CbbR-dimeren aan de promotor een effect heeft op de DNA-keten. Het DNA blijkt niet meer recht te zijn maar gebogen met een hoek van  $64^\circ$  (Hoofdstuk 4); CbbR heeft een vorm aangenomen waarbij het gebonden DNA moet buigen.

#### *CbbR, de sensor*

Zoals al eerder gezegd, worden er in *X. flavus* signalen doorgegeven zodat op tijd autotrofe groei ingezet kan worden. CbbR kan zo'n signaal waarnemen en doorspelen aan de transcriptie-eiwitten. Maar welk signaal wordt opgevangen door CbbR?

We weten dat er in die fase een tekort aan voedingsstoffen is waardoor de assimilatieprocessen op den duur zullen gaan haperen. De aanwezige autotrofe energiebronnen worden op een bepaalde manier omgezet. Beide processen leiden vervolgens tot een situatie waarin bepaalde verbindingen afnemen of ophopen in de cel. Dit zijn de kandidaten voor het signaal dat CbbR opvangt. Mogelijke signalen uit het koolstofmetabolisme zouden tussenproducten van de glycolyse (bijv. fosfo-enolpyruvaat of acetyl-coënzym A) kunnen zijn; een tekort hiervan zou kunnen weergeven dat de opbouw van celmateriaal gestoord is. Voldoende energie zou gesignaleerd kunnen worden door verbindingen die energierijk zijn (bijv. ATP en NAD(P)H); een overschot hieraan impliceert dat er wel energie is maar dat het ongebruikt blijft, wat een ongezonde celconditie tot gevolg kan hebben. Eerder werk had al de suggestie genoemd dat  $\text{CO}_2$ -fixatie verband houdt met een overschot aan energie in de cel. De tussenproducten zijn tevens in staat de activiteit te regelen van bijvoorbeeld het unieke Calvin-cyclusenzym PRK (regulatie op enzymactiviteitsniveau).

Als het signaal CbbR bereikt heeft, ondergaat CbbR structurele aanpassingen waardoor de vorm van het eiwit verandert. Op deze manier transformeert CbbR van sensor naar de activator van transcriptie van autotrofe genen. Verschillende signaalstoffen zijn op veranderingen van de DNA-bindingeigenschappen van CbbR getest (Hoofdstuk 4). Slechts één stofje had een effect op DNA-binding door CbbR en dat was NADPH. NADPH is een stof die gebruikt wordt om assimilatie aan te drijven waarbij het energiearme NADP ontstaat. Door NADPH in verzadigende concentratie aan CbbR toe te voegen, krijgt CbbR een drie keer hogere bindingsaffiniteit voor het DNA van de *cbb*-promotor. Daarbovenop wordt de hoek in het DNA die veroorzaakt wordt door binding van CbbR, kleiner. Een vermindering van  $9^\circ$  is gemeten; de vorm van CbbR verandert zodat de hoek in het DNA kleiner wordt. Ook de concentratie waarbij de helft van CbbR met NADPH verzadigd is, is bepaald.

Deze resultaten zijn sterke aanwijzingen voor de hypothese dat NADPH het effectormolecuul van CbbR is waar na binding transcriptie van het *cbb*-operon kan worden geactiveerd.

#### *In de cel*

Het werk dat hierboven beschreven is, is met de zuivere componenten in kleine reageerbuisjes uitgevoerd. Maar hoeveel van het energierijke stofje NADPH is tijdens heterotrofe en autotrofe groei in *X. flavus* aanwezig?

In Hoofdstuk 5 staat beschreven hoe de concentratie van NADPH en de verwante stof NADH verandert als *X. flavus* naar autotrofe groei overgaat. Ook is gekeken naar de verhouding van de energierijke stoffen NADPH en NADH met de energiearme stoffen NADP en NAD voor en tijdens autotrofe groei. Voor de gezondheid van *X. flavus* is het beter deze verhoudingen constant te houden.

Uit de experimenten volgt dat de genoemde verhoudingen ernstig verstoord raken; ze stijgen beide als *X. flavus* een autotrofe energiebron aangeboden krijgt. De intracellulaire concentratie van het energierijke NADPH stijgt ook vlot naar het punt waarop CbbR in de reageerbuisjes met NADPH verzadigd wordt. Verder blijkt dat de genoemde verhoudingen naar het oorspronkelijke "gezonde" niveau terugkomen zodra de Calvin-cyclus volledig operationeel is waarbij veel energie met  $\text{CO}_2$ -fixatie verbruikt wordt. Tegelijkertijd daalt in *X. flavus* de NADPH-concentratie bijna naar het niveau waarbij in de voorgaande experimenten de helft van CbbR met NADPH verzadigd is.

De gezamenlijke resultaten van de experimenten in reageerbuisjes en in *X. flavus* zijn een krachtige ondersteuning voor de hypothese van transcriptieactivatie van autotrofe genen door een verzadigd CbbR-NADPH-complex. Dit leidt vervolgens tot CO<sub>2</sub>-fixatie door de cel, hierbij zorgend voor gezonde verhoudingen van energie en groei.

#### *CbbR-bindingsplaatsen, de cbb promotor en genexpressie*

Een paar alinea's hierboven is beschreven dat er algemene kenmerken voor een CbbR-bindingsplaats gelden. Hoewel maar twee CbbR-dimeren de *cbb*-promotor kunnen binden, zijn er drie CbbR-bindingsplaatsen aan te wijzen. De hoge affiniteitsbindingsplaats bevat één CbbR-bindingsplaats, IR<sub>1</sub>. De lage affiniteitsbindingsplaats bestaat uit twee elkaar deels overlappende bindingsplaatsen (IR<sub>2</sub> en IR<sub>3</sub>) waarvan er maar één plaats door CbbR bezet kan worden. De opmaak van de *cbb*-promotor wordt dan achtereenvolgens: drie zich naast elkaar bevindende CbbR-bindingsplaatsen (IR<sub>1</sub>, IR<sub>2</sub> en IR<sub>3</sub>), de kernpromotor en dan de start van het eerste gen van het *cbb*-operon.

Door steeds een verandering te maken (muteren) in een bindingsplaats, hebben we het belang van de drie bindingsplaatsen voor binding van CbbR en voor expressie van het *cbb*-operon aangetoond (Hoofdstuk 6). Gebleken is, dat geen van de twee CbbR-dimeren kan binden in de afwezigheid van de hoge affiniteitsplaats (IR<sub>1</sub>). Expressie van het *cbb*-operon is zonder IR<sub>1</sub> ook geannuleerd. Bindingsplaats IR<sub>3</sub> overlapt ook deels de kernpromotor, waardoor de initiatie van transcriptie mogelijk wordt geblokkeerd wanneer een CbbR-dimeer aan IR<sub>3</sub> bindt. Evident is dat mutaties in IR<sub>3</sub> tot gevolg hebben dat er expressie van het *cbb*-operon zonder de noodzaak voor CO<sub>2</sub>-fixatie is. Als wel autotroof gegroeid moet worden, gaat de expressie nog wel omhoog, maar wordt niet zo hoog als bij de originele *cbb*-promotor. Gemuteerde IR<sub>2</sub>-plaatsen lijken qua binding van CbbR vrij normaal; *cbb* expressie is echter onmogelijk. Alledrie de bindingsplaatsen voor CbbR in de *cbb*-promotor zijn dus van belang!

Deze resultaten zijn als volgt te interpreteren. Er is de "lege" *cbb*-promotor. Het eerste CbbR-dimeer bindt de hoge affiniteitsplaats IR<sub>1</sub>. Vervolgens helpt het aanwezige CbbR een tweede CbbR om aan de lage affiniteitsplaats te binden (IR<sub>2</sub> of IR<sub>3</sub>). Waarschijnlijk kan het CbbR tussen IR<sub>2</sub> en IR<sub>3</sub> heen en weer bewegen als reactie op de aan- of afwezigheid van de effector van CbbR, i.e. NADPH. Zonder NADPH bindt CbbR aan de plaatsen IR<sub>1</sub> en IR<sub>3</sub> van de *cbb*-promotor en zorgt voor een hoek van 64° in het DNA. De kernpromotor wordt deels geblokkeerd, het *cbb*-operon wordt niet tot expressie gebracht en *X. flavus* kan niet autotroof groeien. Maar dan is er een toename aan NADPH in *X. flavus* als gevolg van toevoeging en verbruik van autotrofe energiebronnen. CbbR wordt verzadigd met NADPH en het tweede CbbR-dimeer schuift van plaats IR<sub>3</sub> naar IR<sub>2</sub>. De vorm van CbbR verandert; een hoek van 55° in het DNA wordt gerealiseerd. Binding van CbbR aan IR<sub>1</sub> en IR<sub>2</sub> zou het transcriptie-initiatiecomplex aan kunnen trekken naar de kernpromotor om vervolgens transcriptie te activeren. Het *cbb*-operon wordt nu tot expressie gebracht en CO<sub>2</sub>-fixatie zorgt voor groei van *X. flavus*.



